

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030065273 A
(43)Date of publication of application: 06.08.2003

(21)Application number: 1020020039967
(22)Date of filing: 10.07.2002
(30)Priority: 30.01.2002 KR 1020020005369

(71)Applicant: IL HWA CO., LTD.
(72)Inventor: BAE, EUN A
CHOO, MIN GYEONG
HAN, MYEONG JU
KIM, DONG HYEON
LEE, DONG EOK
PARK, EUN GYEONG
SUNG, JONG HWAN

(51)Int. Cl. A61K 35/78

(54) GINSENG BIOCONVERSION COMPOSITION AND PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: A ginseng composition remarkably reinforced in anticancer components such as IH-901 or the like through the culturing of lactic acid bacteria or intestinal bacteria in a ginseng suspension is provided. Therefore, the composition can be used as an antiallergic material by inhibiting histamine release when absorbed by the human body and has effects of inhibiting aging and preventing large intestinal cancer and liver damage.

CONSTITUTION: The bioconversion composition of ginseng is characterized in that the ratio of (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol+Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc+Ginsenoside Rd+Ginsenoside Rb1+Ginsenoside Rb2) is 0.1 or more. The ginseng bioconversion composition is obtained by the following process consisting of: suspending ginseng material in water and culturing in lactic acid bacteria or intestinal bacteria for 24 to 72hr; and then concentrating or freezing/drying the ginseng bioconversion composition as it is, or filtering and concentrating only the supernatant of the ginseng bioconversion composition.



COPYRIGHT KIPO 2003

Legal Status

Date of final disposal of an application (00000000)

Date of registration (00000000)

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.⁷
A61K 35/78

(11) 공개번호 특2003-0065273
(43) 공개일자 2003년08월06일

(21) 출원번호 10-2002-0039967
(22) 출원일자 2002년07월10일

(30) 우선권주장 1020020005369 2002년01월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인 주식회사 일화
경기 구리시 수택동 437번지

(72) 발명자 이동억
서울특별시노원구중계동신안아파트101동2호

성중환
경기도남양주시와부읍덕소리주공3차아파트309동302호

김동현
서울특별시중랑구목1동20번지신내두산아파트528-1001번지

배은아
서울특별시송파구신천동장미아파트31동606호

한명주
서울특별시강남구압구정동369-1현대아파트31-304

추민경
서울특별시서초구방배4동858-33

박은경
서울특별시강남구일원1동도시개발아파트109-1012

(74) 대리인 김희소
김봉희

심사청구 : 있음

(54) 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법

요약

본 발명은 인삼 조성물에 있어서, (20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상임을 특징으로 생물전환 인삼 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 인삼 조성물에 있어서, (20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상이고, 인체에 흡수 시 히스타민의 유리를 억제하여 항알러지 물질로 사용함을 특징으로 생물전환 인삼 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 인삼 조성물의 제조 방법에 있어서, 인삼 원재료를 물에 현탁한 후 유산균 혹은 장내세균을 넣고 24

시간 내지 72시간 내외로 배양하여 생물전환 인삼액을 얻는 생물전환 과정과; 상기 과정을 거친 생물전환 인삼액을 그대로 농축 또는 동결/건조하거나, 상기 생물전환 인삼액을 원심 분리하고 상등액만을 여과하여 생물전환 인삼 농축액을 얻는 농축 과정을 포함함을 특징으로 한 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법을 제공한다.

대표도

도 2

색인어

생물전환, 인삼, 유산균, 장내세균

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법을 나타낸 흐름도,

도 2는 인삼 사포닌의 대사 과정을 나타낸 개략도.

<도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

S10 : 생물전환 과정 S20 : 농축 과정

S30 : 추출 과정 S40 : 건조 과정

S50 : 교반 과정 S60 : 회석 과정

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인삼 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것으로서, 특히 유산균이나 장내세균 처리 과정을 통해 항암 성분이 증강되도록 한 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것이다. 본원 출원은 대한민국 특허출원번호 제2002-5369(2002.01.30) '생물전환 인삼 조성물의 제조 방법'을 기초로 한 국내 우선권 주장 출원임을 밝혀 둔다.

통상적으로, 인삼은 식물 분류학상 오가과 인삼속에 속하는 다년생 숙근초로서 지구상에 약 11종이 알려져 있으며, 대표적인 종은 다음과 같다.

1) 고려 인삼 : *Panax ginseng* C.A.Meyer

- 아시아 극동 지역(북위 33 ~ 48 : 한국, 북만주, 러시아 일부)에 자생하며, 약효가 매우 우수하다.

2) 미국삼 : *Panax quinquefolium* L.

- 미국, 캐나다에 자생 및 재배한다.

3) 전칠삼 : *Panax notoginseng* F.H.Chen

- 중국 운남성 동남부로부터 광서성 서남부 지역에서 야생 또는 재배한다.

4) 죽절삼 : *Panax japonicus* C.A.Meyer

- 일본, 중국 서남부, 네팔에 이르기까지 분포한다.

상기 인삼은 주로 한국, 중국, 일본 등의 아시아 국가에서 생약의 형태로 정신 의학적, 신경계의 질병 및 당뇨병 등 여러가지 질병에 대해 사용되어 왔으며, 상기 인삼의 주요 성분인 사포닌은 강장, 강정, 진정, 조혈 및 항고혈압 등에 효과를 보이는 것으로 증명되어 왔다.

특히, 상기 인삼 사포닌의 미생물 대사 산물인 IH-901, IH-902, IH-903 및 IH-904 등이 면역 증강 작용은 물론 매우 강력한 중앙 혈관 신생 작용 및 암세포 전이 억제 작용을 가지고 있음이 증명됨에 따라 이를 이용한 항암 인삼 조성물의 개발이 요구되고 있다. 하기 <표 1>은 IH-901 등의 암세포 전이 작용 효과를 뒷받침하는 표로서, 쥐에 암세포를 이식한 후 다음날부터 5일간 0.5mg의 약물을 경구 투여하고, 14일 후에 해부하여 폐에 전이한 암의 colony수를 계측한 결과치를 나타내고 있다.

[표 1]

투입 성분	폐전이암 colony수	암폐전이 억제율	유의차 (%control)
IH-901	167.6 ± 62.0	39.1 ± 22.1	p < 0.05
IH-902	139.2 ± 72.9	47.5 ± 27.4	
IH-903	162.0 ± 63.5	39.6 ± 27.9	
IH-904	139.8 ± 6.4	24.0 ± 38.2	

상기 IH-901, IH-902, IH-903 및 IH-904는 인삼의 Ginsenoside 중 protopanaxadiol 타입의 ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 미생물에 의한 최종 대사 산물로서, type IV collagenase secretion의 차단, anti-angiogenic의 활성화 및 platelet aggregation의 억제를 통해 강력한 암세포 전이억제 효과(anti-metastatic activities)를 갖게 한다.

이중, 상기 IH-901은 약리 효능 실험, 일반 약리 실험 및 안정성 실험 등을 통해 밝혀진 바와 같이 독성 및 부작용이 없으면서도 암세포인 HL-60 세포의 정상 분화 과정을 저해하여 세포 증식을 매우 강력히 억제하며, IH-901의 apoptosis 유도 효과는 현재 항암 치료제로 널리 사용되는 cisplatin의 효과와 견줄만큼 강력하다.

한편, 대한민국 특허출원번호 제1980-4291호 '유산균 인삼음료의 제조방법'에는 '인삼의 고유 향기 성분을 분리한 인삼 잔박을 효소 분해하여 유기태 질소 농도가 0.2 ~ 0.8%, 포도당의 생성 함유량이 유산균 발효에 적합한 3% 이상이 되었을 때 유기산으로 pH 3.8 ~ 4.8로 조절한 후 불용성 고분자 단백질을 제거하고 용출액에 유산균을 배양시킨 다음 이에 인삼 고유의 향기 성분을 첨가하는 방법'이 개시되어 있다.

대한민국 특허출원번호 제1988-12502호 '인삼을 이용한 활성 유산균 음료수 제조방법'에는 '인삼을 처리한 생즙이나 엑기스에 또는 인삼을 증자 처리하거나 증자 처리된 이화물에 효소를 작용시킨 것을 기지로 하여 유산균을 배양시킨 후 탈지 우유, 탈지 분유, 탄산수, 비타민류를 첨가 혼합하여 영양가가 높은 인삼 유산균의 탄산수성 음료수와 빙과류를 제조하는 방법'이 개시되어 있다.

대한민국 특허출원번호 제1996-23750호 '인삼 또는 수삼을 함유하는 발효유 조성물 및 그 제조 방법'에는 '마쇄시켜 0.1 ~ 0.6 cm 미립상으로 형성시킨 인삼 또는 수삼을 0.001 ~ 2.39 중량% 첨가하는 공정 및 추가로 물, 비타민, 당류, 유기산류, 과실류, 곡류, 채소류로 구성된 균으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 성분을 첨가하는 공정을 포함하는 인삼 또는 수삼을 함유하는 발효유 조성물의 제조 방법'이 개시되어 있다.

상술한 바와 같이 종래의 인삼이 함유된 조성물들은 기존의 발효유 혹은 유산균 음료 등에 인삼 향기 성분을 추가하거나 인삼 가루 등을 넣음으로써 인삼 성분이 가미된 조성물을 얻을 수 있었다.

그러나, 상기 인삼 함유 조성물들은 단순히 인삼 성분을 첨가한 음료용 조성물에 불과하여, 인삼 사포닌의 대사 산물

인 IH-901과 같은 항암 성분의 효능을 얻을 수 없다는 한계를 가지고 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명의 목적은 IH-901 등 항암 성분이 대폭 강화된 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법을 제공하는데 있다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 인삼 원재료에 함유된 유효 성분의 효능을 극대화할 수 있는 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법을 제공하는데 있다.

또한, 본 발명의 또다른 목적은 항알러지, 노화 방지 및 대장암/간손상 예방 등 인체에 유익한 효능을 가진 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법을 제공하는데 있다.

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인삼 조성물에 있어서, (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상임을 특징으로 생물전환 인삼 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 인삼 조성물의 제조 방법에 있어서, 인삼 원재료를 물에 현탁한 후 유산균 혹은 장내세균을 넣고 48 시간 내지 72시간 내외로 배양하여 생물전환 인삼액을 얻는 생물전환 과정과; 상기 과정을 거친 생물전환 인삼액을 원심 분리하고 상등액만을 여과하여 생물전환 인삼 농축액을 얻는 농축 과정을 포함함을 특징으로 한 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용

이하 본 발명의 바람직한 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하면 다음과 같다. 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

본 발명은 인삼 사포닌의 미생물 최종 대사 산물 중 항암 효능 및 안정성이 뛰어난 IH-901의 함량을 높인 인삼 조성물 및 그 제조 방법을 제공한다.

도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법을 나타낸 흐름도이다. 도 1에 도시된 바와 같이 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법은 생물전환 과정(S10) 및 농축 과정(S20)을 포함하고, 추출 과정(S30), 건조 과정(S40), 교반 과정(S50) 및 회석 과정(S60)을 추가로 수행할 수 있다.

1. 생물전환 과정(Bioconversion process)

상기 생물전환 과정(S10)은 인삼 원재료를 물에 현탁한 후 유산균 혹은 장내세균을 넣고 일정 시간 이상, 바람직하게는 24시간 내지 72시간 내외로 배양하여 생물전환 인삼액을 얻는 과정이다.

(1) 인삼 원재료

본 발명의 인삼 원재료로는 인삼 및 인삼 가공물이면 어느 것이든 가능하며, 바람직하게는 수삼, 홍삼, 백삼, 미삼, 인삼잎, 인삼 추출액 및 인삼 분말 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.

(2) 유산균과 장내세균

유산균과 장내세균 중 일부는 음식물이나 약물 중에 함유된 화합물들을 생물전환하는데, 이때 생성된 생물전환체들은 원화합물에 비해 생리활성이 높은 경우가 다수 있다. 도 2에 도시된 바와 같이 본 발명의 원재료인 인삼에 함유된 화합물인 Ginsenoside-Rb1, Ginsenoside-Rb2, Ginsenoside-Rc 등이 이러한 경우에 해당하며, 이들은 유산균(Lactic acid bacteria)이나 장내세균(intestinal bacteria)에 의해 대사되어 1차 중간 대사물인 Ginsenoside-Rd, Compound-O, Ginsenoside-Mc1 및 2차 중간 대사물인 Ginsenoside-F2, IH-902(Compound-Y), IH-903(Compound-Mc)을 거쳐 최종 대사 산물인 IH-901(Compound-K)이 된다.

상기 유산균으로는 인삼 사포닌 성분을 대사시켜 생물전환체인 IH-901을 생성할 수 있는 것이면 어느 것이나 가능하며, 바람직하게는 Biofidobacterium K-103, Biofidobacterium K-506, Bifobacterium KK-1, Bifidobacterium K

K-2 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있다. 특히, 상기 Bifobacterium KK-1은 기탁번호 KCCM-10364(2002.03.22)로, 상기 Bifidobacterium KK-2은 기탁번호 KCCM-10365(2002.03.22)로 각각 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁된 바 있다.

상기 장내세균 역시 인삼 사포닌 성분을 대사시켜 생물전환체인 IH-901을 생성할 수 있는 것이면 어느 것이나 가능하며, 바람직하게는 Prevotella oris, Fusobacterium K-60 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.

2. 농축 과정(Thickening process)

상기 농축 과정(S20)은 생물전환 인삼액을 그대로 농축 또는 동결/건조하거나, 상기 생물전환 인삼액을 원심 분리하고 상등액만을 여과하여 생물전환 인삼 농축액을 얻는 과정이다. 상기 농축 과정(S20)을 통해 생물전환 인삼액에 포함된 불순물 및 침전물을 제거할 수 있다.

3. 추출 과정(Extraction process)

상기 추출 과정(S30)은 생물전환 인삼 농축액에 미리 설정된 용매를 투여하여 생물전환 인삼 추출액을 얻는 과정이다.

상기 용매는 생물전환 인삼 농축액에 포함된 유효 성분만을 용해시켜 추출하는 역할을 하며, 상기 용매로는 물, 메탄올이나 에탄올 같은 저급 알콜, 초임계 유체 또는 이들의 혼합액을 이용할 수 있다.

4. 건조 과정(Drying process)

상기 건조 과정(S40)은 생물전환 인삼 추출액을 동결 건조하여 생물전환 인삼 분말을 얻는 과정이다.

5. 교반 과정(Agitation process) 및 희석 과정(Dilution process)

상기 교반 과정과 희석 과정은 본 발명의 특징에 따라 제조된 생물전환 인삼 추출액 혹은 생물전환 인삼 분말 등을 이용하여 가공 음료를 제조하기 위해 수행되는 과정이다.

상기 교반 과정(S50)은 감미료에 정제수를 넣고 혼합한 음료 원액에 생물전환 인삼 추출액 혹은 생물전환 인삼 분말을 넣고 교반시켜 생물전환 인삼 혼합액을 얻는 과정이다. 상기 음료 원액에는 구연산, 구연산 나트륨, 생약 추출물, 타우린 중 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 응용예에 따라서는 생약 추출물인 오미자, 대추, 계피, 구기자, 황정, 황기 등을 첨가할 수도 있다.

상기 희석 과정(S60)은 생물전환 인삼 혼합액에 미리 설정된 용량의 정제수를 가하여 생물전환 인삼 음료액을 얻는 과정이다.

상기와 같은 과정에 의해 제조된 본 발명의 생물전환 인삼 조성물은 (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상 범위를 유지한다. 이때, 상기 20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol(20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사다이올)은 IH-901을 말한다.

<실시예 1>

미삼을 물로 추출하여 건조한 후 획득한 인삼 분말 100mg을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium K-103과 Bifidobacterium K-506 균주를 넣고 72시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다.

<실시예 2>

백삼 1kg을 MeOH로 냉침하여 얻은 추출액을 다시 BuOH로 추출하여 얻은 사포닌 분획을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium K-103과 Bifidobacterium K-506 균주를 넣고 72시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다.

<실시예 3>

수삼을 잘게 썰어 멸균한 것을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium K-103과 Bifidobacterium K-506 균주를 넣고 48시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하고, 이를 동결 건조하여 생물전환 인삼 분말을 얻었다.

<실시예 4>

미삼을 물로 추출하여 건조한 후 획득한 인삼 분말 100mg을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium KK-1과 Bifidobacterium KK-2 균주를 넣고 72시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다.

<실시예 5>

백삼 1kg을 MeOH로 냉침하여 얻은 추출액을 다시 BuOH로 추출하여 얻은 사포닌 분획을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium KK-1과 Bifidobacterium KK-2 균주를 넣고 72시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다.

<실시예 6>

수삼을 잘게 썰어 멸균한 것을 물로 현탁한 후 유산균 Bifidobacterium KK-1과 Bifidobacterium KK-2 균주를 넣고 48시간동안 배양하고, 이를 원심분리하여 상등액만을 여과한 후 농축하고, 이를 동결 건조하여 생물전환 인삼 분말을 얻었다.

<실시예 7>

과당, 포도당 및 백당에 정제수를 가하여 95℃까지 가열하여 용해시킨 후에, 서서히 냉각시켜 70℃까지 냉각시키고, 여기에 구연산, 구연산나트륨 및 안식향산나트륨을 가하면서 교반하여 용해시킨다. 이어, 오가피 추출액 및 타우린을 교반하면서 용해시켰다. 이와 같이 생성된 용액에 생물전환 인삼 분말을 가하여 충분히 교반한 후 총용량이 100ml가 되도록 적정 정제수를 가함으로써 생물전환 인삼 추출물 250mg을 함유하는 음료 조성물 100ml를 제조하였다.

<실험예 1 : 함량 분석 1>

백삼 분말 2g에 물 500ml를 가한 후, 유산균 Bifidobacterium KK-1과 Bifidobacterium KK-2 균주 각 1g을 넣고 37℃에서 72시간동안 배양하고 감압 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다. 이어, 상기 생물전환 인삼 농축액과 시판품인 일반 백삼 2g씩을 취하여 메탄올 100ml씩으로 3회 추출하고 농축시킨 후에 물에 현탁시키고, 에테르 100ml씩으로 3회 추출하였다. 이어, 부탄올 100ml씩으로 3회 추출한 후에 부탄올 분획을 농축시키고, 수득된 농축물을 메탄올에 용해시켜 TLC로 분석하여 하기 <표 2>와 같은 결과를 얻었다.

[표 2]

성분	성분별 함량	
	백삼	생물전환 인삼
Ginsenoside Rb1	15.1	4.3
Ginsenoside Rb2	8.2	2.2
Ginsenoside Rc	9.5	1.1
Ginsenoside Rd	3.5	4.5
IH-901	0	16.1
Ginsenoside F2	< 1	5.5
Protopanaxadiol	< 1	< 1

(1) 용매 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 65 : 35 : 10의 하층

(2) 발색시약 5% 황산MeOH 용액

(3) Detector Shimadzu TLC scanner CS-9301PC

<실험예 2 : 함량 분석 2>

백삼 사포닌 분획 1g에 물 100ml를 가한 후, 유산균 Bifidobacterium KK-1과 Bifidobacterium KK-2 균주 각 1g을 넣고 37℃에서 48시간동안 배양하고 감압 농축하여 생물전환 인삼 농축액을 얻었다. 이어, 상기 생물전환 인삼 농축액과 백삼 사포닌 1g씩을 각각 메탄올에 용해시켜 TLC로 분석하여 하기 <표 3>과 같은 결과를 얻었다.

[표 3]

성분	성분별 함량	
	백삼	생물전환 인삼
Ginsenoside Rb1	15.1	1.6
Ginsenoside Rb2	8.2	1.1
Ginsenoside Rc	9.5	0.5
Ginsenoside Rd	3.5	0.5
IH-901	0	28.6
Ginsenoside F2	< 1	2.2
Protopanaxadiol	< 1	2.1

(1) 용매 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 65 : 35 : 10의 하층

(2) 발색시약 5% 황산MeOH 용액

(3) Detector Shimadzu TLC scanner CS-9301PC

<실험예 3 : 항암 효과 분석>

HepG2(Human liver cancer cell line), A-549(Human lung cancer cell line), P-388(Mouse lymphoid neoplasm a cell line), L-1210(Mouse lymphocytic leukemia cell line)를 10% FBS, 1% antibiotics-antimycotics 및 2.2g/L sodium bicarbonate을 보강한 RPMI 1640 medium으로 배양하였다.

상기 HepG2, A-549는 0.25% trypsin으로 처리하여 cell을 flask에서 떼어내고 cell수를 3 x 10⁴ cell/well로 맞추어 96well에 180μl를 깔아 24시간 동안 37℃의 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 부착시켰고, P-388과 L-1210은 4 x 10⁴ /well이 되게 cell수를 맞추어 180μl를 깔아 2시간 동안 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 안정화시켰다. 그리고, 인삼 추출물 및 생물전환인삼 추출물을 각각 10mg/ml가 되게 농도를 맞추어 고압 증기 멸균한 후, well당 20μl를 가하여 시료의 최종 농도가 1mg/ml가 되게 한 후 48시간 동안 37℃의 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 배양시켰다. 48시간 후 20mg/ml의 MTT시약을 well당 50μl씩 가하여 4시간동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 후, 배지를 건어내고 침전에 DMSO 100μl를 가하여 580nm 에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포 독성을 측정하였다. 측정 결과는 하기 <표 4>에 나타난 바와 같다.

[표 4]

구분	ED ₅₀ (μg/ml)			
	P388	L1210	A549	HepG2
일반인삼추출물	> 100	> 100	> 100	> 100

생물전환인삼	98	50	160	96
--------	----	----	-----	----

<실험예 4 : 항알러지 효과 분석 1>

RBL-2H3 cell(rat mast cell line)을 10% fetal bovine serum과 L-glutamine을 포함하는 Dulbeccos' Modified Eagle's Medium(DMEM)을 이용하여 37℃, humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며 고착성을 갖는 세포를 trypsin-EDTA solution을 사용하여 부유시켜 이를 분리, 회수하여 실험에 사용하였다.

RBL-2H3 cell을 24 well에 각각 5 × 10⁵ cell/well씩 분주한 후 mouse monoclonal IgE 0.5μg/ml를 넣어 12시간 incubation시키며 sensitization시켰다. 상기 cell을 0.5ml의 siraganian buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 씻어준 후 0.16ml의 siraganian buffer(5.6mM glucose, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA를 첨가)를 넣은 다음 37℃에서 10분간 incubation시켰다.

이어, 인삼 추출물 및 생물전환 인삼추출물 시료 0.04ml를 각각 가한 다음 20분 경과한 후에 0.02ml의 antigen(DNP-BSA 1μg/ml)으로 37℃에서 10분간 cell을 activation시킨 다음 2000rpm에서 10분간 원심 분리하여 0.025ml의 상등액을 96well로 옮겼다. 여기에 0.025ml의 기질액 1mM p-NAG(p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide in 0.1M citrate buffer pH 4.5)를 가한 후 37℃에서 60분간 배양시킨 다음, 0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.2ml를 가하여 반응을 정지시키고 405nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 하기 <표 5>에 나타난 바와 같다.

[표 5]

구분	IC ₅₀ (mg/ml)
일반인삼추출물	> 0.25
생물전환인삼	0.103
Disodium cromoglycate	0.22

<실험예 5 : 항알러지 효과 분석 2 - 히스타민 유리 억제>

생쥐의 복강내로부터 compound K 48/80을 이용하여 항알러지 효과를 측정하기 위해 Male Wistar rat(200±20g)을 죽인 후 physiological solution(137mM NaCl, 2.7mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ · 6H₂O, 5.6mM glucose, heparin 1unit/ml, 5mM phosphate buffer pH7.2) 20ml을 복막내에 투여하였다. 그리고, 복부를 가볍게 2분간 마사지하고 복막 배출액을 다시 주사기로 뽑아내었다. 뽑아낸 복수는 300 ×g, 4℃에서 5분간 원심분리하였으며 physiological solution으로 여러 번 세척하였다.

이어, 복막 배출 cell 현탁액(2.5ml)에 각 시료를 다양한 농도로 현탁한 physiological solution 0.5ml을 혼합한 후 37℃에서 5분간 preincubation 하였다. control과 blank도 같은 방법으로 처리하였다. 그리고 나서 반응액(3.0ml)에 compound 48/80을 0.5ml 혼합하고 37℃에서 10분간 다시 incubation하였다. 반응액(3.5ml)은 2500 ×g, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 침전에서 분리된 histamine의 양을 측정하였다. Histamine의 정량은 앞의 상등액 0.6ml, 증류수 1.4ml, 1N NaOH 0.4ml, 1% o-phthaldialdehyde(in MeOH) 0.1ml을 4분간 상온에서 반응후 3N HCl 0.2ml로 반응을 정지시키고 spectrofluorometer(Jasco FP-750, excitation 353nm, emission 438nm)로 측정하였다. 측정 결과는 하기 <표 6>에 나타난 바와 같다.

일반 인삼 및 생물전환인삼 모두 compound 48/80으로 유도한 흰쥐 비만세포에서의 히스타민 유리 억제효과를 측정 한 결과 히스타민 유리 억제효과를 나타냈으며, 특히 생물전환 인삼이 인삼추출물보다 더 낮은 농도에서 효과를 나타냄을 볼 수 있었다. 따라서, 본 발명의 생물전환 인삼 조성물은 인체에 흡수시 히스타민의 유리를 억제하여 항알러지 물질로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[표 6]

구분	IC ₅₀ (mg/ml)
일반인삼추출물	0.5
생물전환인삼	0.3
Disodium cromoglycate	0.22

<실험예 6 : 항알러지 효과 분석 3>

본 항알러지 효과 분석 3은 아래와 같은 Inagaki 등의 방법(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 87, 254-259, 1988)에 따라 실시하였다.

Dinitrophenol-bovine serum albumin(DNP-BSA)에 대한 IgE 혈청을 생리식염수로 희석한 10 μ g를 에테르로 마취시킨 생쥐의 등에 주사하고 수동감작시키고 48시간 후 DNP-BSA 0.2mg과 evans blue 1.6mg을 포함한 생리식염수 0.2ml를 꼬리정맥에 주사하고 30분후 경부탈골로 치사시켜 등에 누출된 evans blue 색소량을 측정한다. 생쥐의 등 일정 부위를 잘라 시험관에 넣고 1N-KOH 0.7 ml을 넣고 37℃에서 하룻밤 동안 배양한다. 이 시험관에 0.6N 인산:아세트 혼액(5:13) 4ml를 가한 다음 진탕하고 여과하여 추출된 색소를 620nm에서 비색 정량한다. 이어, 인삼추출물과 생물전환인삼추출물을 각각 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 경구 또는 복강으로 항원투여 1시간 전에 투여한다. 그에 따른 측정 결과는 하기 <표 7>에 나타난 바와 같다.

[표 7]

구분	용량 (mg/kg)	Inhibition(%)	
		경구투여	복강투여
일반인삼추출물	50	0	5
생물전환인삼	50	48	52
Disodium cromoglycate	100	37	미측정

<실험예 7: 항산화 효과 - 라디칼 소거에 따른 노화 방지>

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거효과를 측정하기 위해 반응액에 60 μ M DPPH(in EtOH) 500 μ l에 시료 500 μ l를 넣어 상온에서 30분 반응시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. blank로 DPPH 대신 EtOH 사용하였으며 대조군으로는 시료 대신 물을 사용하였을 때를 100%로 하여 DPPH radical 제거 정도를 %로 구했다. 대조약물로는 caffeic acid를 사용하였다.

또한, Superoxide Anion Radical 소거효과를 측정하기 위해 반응액에 0.05M Na₂CO₃ (pH 10.2) 900 μ l에 3mM xanthine(Sigma사), 3mM EDTA(Sigma 사), 1.5 μ g/ml BSA(Sigma사), 0.75mM NBT(Sigma사) 50 μ l씩을 각각 첨가하였다. 여기에 시료 50 μ l와 0.1 μ g/ml xanthine oxidase 50 μ l를 가해 30분간 반응시킨 후 6mM CuCl₂를 넣어 반응을 정지시키고 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물로는 caffeic acid를 사용하였다.

항산화에 대한 효과에서 인삼사포닌분획은 강하지 않았다. 하지만, 일반 인삼에 비해 생물전환 인삼이 우수했으며, 이러한 항산화효과는 노화방지 등의 효과를 기대할 수 있다. 그에 따른 측정 결과는 하기 <표 8>에 나타난 바와 같다. 따라서, 본 발명의 생물전환 인삼 조성물은 인체에 흡수시 라디칼 소거로 인한 항산화 작용을 일으키므로 노화 방지용 물질로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[표 8]

구분	50% 저해 농도(mM)	
	DPPH radical	Super oxide 라디칼
일반인삼추출물	0.8	0.14
생물전환인삼	0.7	0.11
Caffeic acid	0.004	0.004

<실험예 8 : 대장암/간손상 유발 β - glucuronidase 저해 효과>

사람의 장내세균이 생산하는 β - glucuronidase는 대장암 및 간손상을 일으키며, 이 효소를 저해하는 물질은 대장암 및 간손상 예방 효과가 있는 것으로 알려져있다(D.H. Kim, I.S. Jang, J.B. Park, S.W. Lee, Protective roles of mushrooms in experimental colon carcinogenesis. Arch. Pharm. Res. 18, 79-83, 1995; D.H. Kim, S.B. Shim, N.J. Kim, I.S. Jang, β - glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effects of Ganoderma lucidum. Biol. Pharm. Bull. 22, 162-164, 1999).

그에 따라, 인삼과 생물전환 인삼이 β - glucuronidase 효소를 저해하는 지를 Kim 등의 방법(D.H. Kim, S.B. Shim, N.J. Kim, I.S. Jang, -Glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effects of Ganoderma lucidum. Biol. Pharm. Bull. 22, 162-164, 1999)에 따라 실시하였다.

먼저, 사람의 장내에서 분리한 Escherichia coli HGU-3 균주를 배양하여 김등의 방법에 따라 β -glucuronidase를 정제하였다. 50mM 인산완충액 0.38ml, 20mM p-nitrophenyl- β -D-glucuronide(Sigma 사, 미국) 0.02ml, 물 또는 인삼추출액 0.05ml 및 효소액 0.05ml을 넣고 30분간 반응시킨후 0.2N NaOH 0.5ml을 넣어 반응을 정지시키고 흡광도 405nm에서 측정하여 저해활성을 계산하였다.

측정한 결과는 하기 <표 9>와 같다. 측정 결과와 같이 본 발명의 생물전환 인삼은 대장암 및 간손상을 유발하는 β -glucuronidase를 저해함으로써 대장암 및 간손상 예방 물질로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[표 9]

구분	IC ₅₀ (mg/ml)
일반인삼추출물	0.2
생물전환인삼	0.1
Saccharic acid 1,4-lactone	0.004

발명의 효과

상술한 바와 같이 본 발명의 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법은 (20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상을 유지함으로써 항암 성분이 대폭 강화된 생물전환 인삼 조성물을 제공하는 효과가 있다.

또한, 본 발명의 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법은 인삼 원재료에 함유된 사포닌 성분을 생물전환시켜 생리활성이 높은 대사물을 생성시킴으로써, 사포닌 등의 유효 성분 함량이 낮아 인삼 가공물의 원료로 사용하기에 부적합했던 인삼잎 등도 원재료로 활용할 수 있는 효과가 있다.

또한, 본 발명의 실시예에 따른 생물전환 인삼 조성물 및 그 제조 방법은 인체에 흡수시 히스타민의 유리를 억제하여 항알러지 작용을 하고, 라디칼 소거로 인한 항산화 작용을 일으켜 노화를 억제하며, 장내세균이 생산하는 β - glucuronidase의 생성을 저해하여 대장암 및 간손상을 예방하는 효과가 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인삼 조성물에 있어서,

(20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상임을 특징으로 생물전환 인삼 조성물.

청구항 2.

인삼 조성물에 있어서,

(20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상이고, 인체에 흡수시 히스타민의 유리를 억제하여 항알러지 물질로 사용함을 특징으로 생물전환 인삼 조성물.

청구항 3.

인삼 조성물에 있어서,

(20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상이고, 인체에 흡수시 라디칼 소거로 인한 항산화 작용을 일으켜 노화 방지용 물질로 사용함을 특징으로 생물전환 인삼 조성물.

청구항 4.

인삼 조성물에 있어서,

(20-0-β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol + Ginsenoside F)/(Ginsenoside Rc + Ginsenoside Rd + Ginsenoside Rb1 + Ginsenoside Rb2)의 비율이 0.1 이상이고, 인체에 흡수시 장내세균이 생산하는 β - glucuronidase의 생성을 저해하여 대장암 및 간손상 예방 물질로 사용함을 특징으로 생물전환 인삼 조성물.

청구항 5.

인삼 조성물의 제조 방법에 있어서,

인삼 원재료를 물에 현탁한 후 유산균 혹은 장내세균을 넣고 24시간 내지 72시간 내외로 배양하여 생물전환 인삼액을 얻는 생물전환 과정과;

상기 과정을 거친 생물전환 인삼액을 그대로 농축 또는 동결/건조하거나, 상기 생물전환 인삼액을 원심 분리하고 상등액만을 여과하여 생물전환 인삼 농축액을 얻는 농축 과정을 포함함을 특징으로 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서,

상기 인삼 원재료로는 수삼, 홍삼, 백삼, 미삼, 인삼잎, 인삼 추출액 및 인삼 분말 중 어느 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 7.

제 5항에 있어서,

상기 유산균으로는 Bifobacterium KK-1, Bifidobacterium KK-2 중 어느 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 8.

제 5항에 있어서,

상기 유산균으로는 Biofidobacterium K-103, Biofidobacterium K-506 중 어느 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 9.

제 5항에 있어서,

상기 유산균으로는 Bifobacterium KK-1, Bifidobacterium KK-2, Biofidobacterium K-103, Biofidobacterium K-506 중 어느 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 10.

제 5항에 있어서,

상기 장내세균으로는 Prevotella oris, Fusobacterium K-60 중 어느 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 11.

제 5항에 있어서,

상기 농축 과정 이후에는,

생물전환 인삼 농축액에 미리 설정된 용매를 투여하여 생물전환 인삼 추출액을 얻는 추출 과정을 추가로 수행함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 12.

제 7항에 있어서,

상기 추출 과정 이후에는,

감미료에 정제수를 넣고 혼합한 음료 원액에 상기 생물전환 인삼 추출액을 넣고 교반시켜 생물전환 인삼 혼합액을 얻는 교반 과정과;

상기 생물전환 인삼 혼합액에 미리 설정된 용량의 정제수를 가하여 생물전환 인삼 음료액을 얻는 희석 과정을 추가로 수행함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 13.

제 12항에 있어서,

상기 교반 과정의 음료 원액에는 구연산, 구연산 나트륨, 생약 추출물, 타우린 중 어느 하나 이상을 첨가함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 14.

제 11항에 있어서,

상기 추출 과정 이후에는,

생물전환 인삼 추출액을 동결 건조하여 생물전환 인삼 분말을 얻는 건조 과정을 추가로 수행함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

청구항 15.

제 14항에 있어서,

상기 건조 과정 이후에는,

감미료에 정제수를 넣고 혼합한 음료 원액에 상기 생물전환 인삼 분말을 넣고 교반시켜 생물전환 인삼 혼합액을 얻는 교반 과정과;

상기 생물전환 인삼 혼합액에 미리 설정된 용량의 정제수를 가하여 생물전환 인삼 음료액을 얻는 희석 과정을 추가로 수행함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

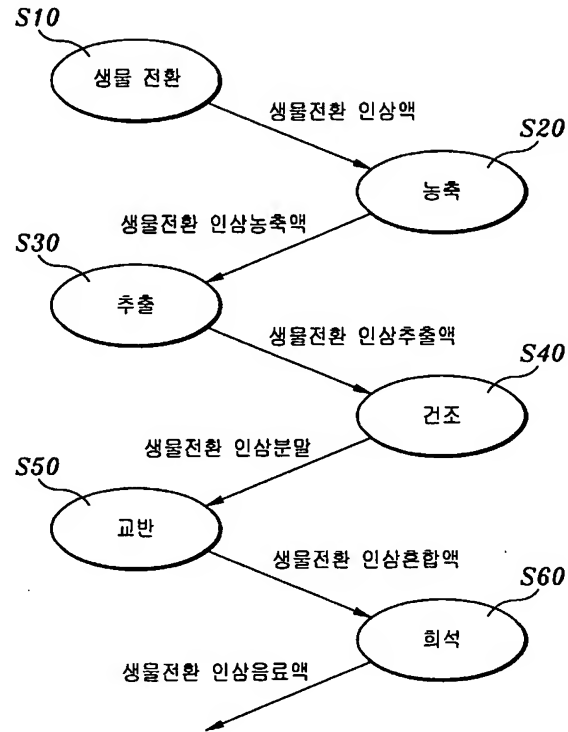
청구항 16.

제 15항에 있어서,

상기 교반 과정의 음료 원액에는 구연산, 구연산 나트륨, 생약 추출물, 타우린 중 어느 하나 이상을 첨가함을 특징으로 하는 생물전환 인삼 조성물의 제조 방법.

도면

도면1



도면2

